

7

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

24 février 2000 (24.02.00)

Demande internationale no

PCT/FR99/01813

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

ST 98023

Date du dépôt international (jour/mois/année)

23 juillet 1999 (23.07.99)

Date de priorité (jour/mois/année)

24 juillet 1998 (24.07.98)

Déposant

SARKIS, Chamsy etc

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

26 janvier 2000 (26.01.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Kiwa Mpay

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

ant

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

LANCELOT, Géraldine
Aventis Pharma
Direction Brevets-Tri LE1 144
20 Avenue Raymond Aron
F-92165 Antony Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

29 février 2000 (29.02.00)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

ST 98023

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no

PCT/FR99/01813

Date du dépôt international (jour/mois/année)

23 juillet 1999 (23.07.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 Avenue Raymond Aron
F-92160 Antony
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

FR

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☒ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse

AVENTIS PHARMA S.A.
20 Avenue Raymond Aron
F-92160 Antony
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

FR

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

Prrière de noter également l'adresse modifiée du mandataire.

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Jocelyne Rey-Millet

no de téléphone (41-22) 338.83.38

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ST 98023	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01813	International filing date (day/month/year) 23 July 1999 (23.07.99)	Priority date (day/month/year) 24 July 1998 (24.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/866		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 26 January 2000 (26.01.00)	Date of completion of this report 22 September 2000 (22.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01813

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-22, filed with the letter of 23 August 2000 (23.08.2000),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/8-8/8, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18, 22	YES
	Claims	19-21	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-22	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following document:

D1: WO-A-98/11243.

2. D1 describes a recombinant baculovirus which expresses VSV (vesicular stomatitis virus) glycoprotein and comprises the sequence coding for a heterologous gene expressed in the cells of a mammalian nervous system, subject to a promoter (abstract; page 3, lines 28 to 31; page 4, lines 19 to 31; page 5, lines 5 to 13 and 17 to 22; page 71, lines 23 to 32). The heterologous gene mentioned in D1 codes inter alia for a product of therapeutic interest in the treatment of diseases of the nervous system (for example NGF, FGF, GDNF, neurotrophins and so on), or an anti-sense sequence (page 5, lines 5 to 17; page 22, lines 20 to 22). D1 describes the use of the promoter of tyrosine hydroxylase, in particular for controlling the expression of the heterologous gene (page 19, lines 10 to 17; page 19, line 32 to page 20, line 2).

D1 describes the use of such recombinant baculoviruses for expressing the heterologous gene in mammalian cells *in vivo* or *in vitro*, in

particular the cells of the nervous system (page 29, lines 13 and 14; page 47, lines 3 to 5; Table 4; page 66, lines 18 to 29; page 76, lines 9 to 22). Pharmaceutical compositions comprising the recombinant baculoviruses of D1 and a vehicle acceptable for pharmaceutical purposes can be prepared (page 64, lines 14 to 16). D1 mentions in particular the use of cells infected *ex vivo* by the recombinant baculoviruses described for an *in vivo* implantation, together with the use of the recombinant baculoviruses for expressing a heterologous gene *in vivo*, by means of intramuscular administration (page 64, line 14 to page 71, line 21). Consequently, in view of D1 the subject matter of Claims 19 to 21 is not novel.

3. It is known from the prior art that recombinant baculoviruses with a baculovirus envelope protein and comprising a sequence coding for a reporter gene have a significant expression for said gene in neuron-type cells, including cells of the line PC12 (see description, page 2, lines 14 to 17, and page 2, line 24 to page 3, line 2). The subject matter of Claims 1 to 4 differs from these recombinant baculoviruses since the claimed recombinant baculoviruses comprise a heterologous nucleic acid sequence coding for a product of therapeutic interest in the treatment of diseases of the nervous system. Taking into account that the known recombinant baculoviruses can express a reporter gene in neuron-type cells, a person skilled in the art would, simply by applying this knowledge, automatically arrive at the subject matter of Claims 1 to 4. The subject matter of these claims is not therefore inventive.

The use of a non-inventive product according to known methods cannot be considered inventive. The subject matter of Claim 22 is not therefore inventive.

Consequently, Claims 1 to 4 and 22 do not meet the requirements of PCT Article 33(3).

4. The subject matter of Claims 5 to 9 and 11 to 18 differ from D1 in terms of the gene of therapeutic interest in the recombinant baculovirus, the gene coding for β -glucuronidase. Some of the genes involved in lysosomal diseases, in particular the gene coding for β -glucuronidase, are known from the prior art. Consequently, simply by applying his or her knowledge a person skilled in the art would, particularly in view of D1, arrive at the subject matter of Claims 5 to 9 and 11 to 18. These claims are not therefore inventive. In this context, it should be noted that the reference to certain products of genes introduced by the expression "such as" (Claims 4 and 14) and the reference to certain cell populations introduced by the expression "e.g." (Claim 16) are included as examples, are in no way exhaustive and cannot be considered to limit the subject matter of the claim(s) concerned. The subject matter of Claim 10 also differs from D1 with respect to the use of signal sequences. The use of such sequences for secreting or for the cell compartmentalization of the product of a gene is known to a person skilled in the art and does not involve an inventive step. Consequently, in view of D1 and by applying his or her basic knowledge such a person would also arrive at the subject matter of Claim 10. This claim is not therefore inventive.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01813

Claims 5 to 18 do not meet the requirements of PCT
Article 33(3).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 26 SEP 2000

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98023	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01813	Date du dépôt international (jour/mois/année) 23/07/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 24/07/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/866		
Déposant RHONE-POULENC ROGER S.A. et al. AVENTIS PHARMA S.A.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.



2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 3 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 26/01/2000	Date d'achèvement du présent rapport 22.09.00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Chavanne, F N° de téléphone +49 89 2399 8399 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01813

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-22 reçue(s) avec télécopie du 23/08/2000

Dessins, feuilles:

1/8-8/8 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01813

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-18, 22
	Non : Revendications 19-21
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-22
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-22
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

V. Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence au document suivant:

D1: WO 98/11243

2. D1 décrit un baculovirus recombinant qui exprime la glycoprotéine de VSV (vesicular stomatitis virus), et qui comprend la séquence codante d'un gène hétérologue exprimé dans les cellules du système nerveux de mammifère, sous le contrôle d'un promoteur (résumé; page 3, lignes 28-31; page 4, lignes 19-31; page 5, lignes 5-13 et 17-22; page 71, lignes 23-32). Le gène hétérologue mentionné dans D1 code notamment pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux (par exemple, le NGF, FGF, GDNF, des neutrotrophines, etc...), ou une séquence antisens (page 5, lignes 5-17; page 22, lignes 20-22). D1 décrit l'utilisation du promoteur de la tyrosine hydroxylase, notamment, pour le contrôle de l'expression du gène hétérologue (page 19, lignes 10-17; page 19, ligne 32 à page 20, ligne 2). D1 décrit l'utilisation de tels baculovirus recombinant pour l'expression du gène hétérologue dans les cellules de mammifère, in vivo ou in vitro, notamment les cellules du système nerveux (page 29, lignes 13 et 14; page 47, lignes 3-5; table 4; page 66, lignes 18-29; page 76, lignes 9-22). Des compositions pharmaceutiques comprenant les baculovirus recombinants de D1 ainsi qu'un véhicule pharmaceutiquement acceptable peuvent être élaborées (page 64, lignes 14-16). Les baculovirus recombinants décrits dans D1 peuvent être utilisés dans D1 mentionne notamment l'utilisation de cellules infectées *ex-vivo* par les baculovirus recombinants décrits pour une implantation *in vivo*, ainsi que l'utilisation des baculovirus recombinants pour l'expression d'un gène hétérologue *in vivo*, par administration intramusculaire (page 64, ligne 14 à page 71, ligne 21). Par conséquent, au vu de D1, l'objet des revendications 19-21 n'est pas nouveau.
3. Il est connu dans l'état de la technique que des baculovirus recombinants ayant une protéine d'enveloppe baculovirus et comprenant une séquence codant pour un gène rapporteur présentent une expression significative de ce gène rapporteur

dans des cellules de type neuronal, les cellules de la lignée PC12 (voir description page 2, ligne 14-17, et page 2 ligne 24 à page 3, ligne 2). L'objet des revendications 1-4 se différencie de ces baculovirus recombinants par le fait que les baculovirus recombinants revendiqués comprennent une séquence d'acide nucléiques hétérologues codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux. Or, sachant que les baculovirus recombinants connus peuvent exprimer un gène rapporteur dans des cellules de type neuronal, l'homme du métier, par la simple mise en oeuvre de ces connaissances arriverait automatiquement à l'objet des revendications 1-4. L'objet de ces revendications n'est donc pas inventif.

L'utilisation d'un produit non inventif selon des méthodes connues ne peut être considérée inventive. L'objet de la revendication 22 n'est donc pas inventif.

Par conséquent, les revendications 1-4 et 22 ne remplissent pas les conditions de l'Article 33(3) PCT.

4. L'objet des revendications 5-9 et 11-18 se différencie de D1 par le gène d'intérêt thérapeutique compris dans le baculovirus recombinant, le gène codant pour la β -glucuronidase. Certains des gènes impliqués dans les maladies lysosomiales et notamment le gène codant pour la β -glucuronidase sont connus dans l'état de la technique. Par conséquent, par la simple mise en oeuvre de ses connaissances, l'homme du métier, au vu notamment de D1, arriverait à l'objet des revendications 5-9 et 11-18. Ces revendications ne sont donc pas inventives. Dans ce contexte, il est à noter que la référence à certains produits de gènes introduits par l'expression "tels que" (revendications 4 et 14), ainsi que la référence à certaines populations de cellules introduites par l'expression "e.g." (revendication 16) sont introduites à titre d'exemple indicatif et en aucun cas exhaustif, et ne peuvent être considérées comme limitant l'objet de la ou des revendications concernées. L'objet de la revendication 10 se différencie en plus de D1 par l'utilisation de séquences signal. L'utilisation de séquences signal pour la sécrétion ou pour la compartimentalisation cellulaire du produit d'un gène est connue de l'homme du métier et n'implique aucune activité inventive. Par conséquent, au vu de D1 et en mettant en oeuvre ses connaissances de base, l'homme du métier arriverait également à l'objet de la revendication 10. Cette revendication n'est donc pas inventive.

Les revendications 5-18 ne remplissent pas les conditions de l'Article 33(3) PCT.

REVENDICATIONS

1. Baculovirus recombinant ayant une protéine d'enveloppe baculovirus, comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux.
- 5 2. Baculovirus selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
3. Baculovirus selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique choisi parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de
10 neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.
4. Baculovirus selon la revendication 3, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF,
15 l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et le TGF- β .
5. Baculovirus recombinant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique hétérologue codant pour la β -glucuronidase.
- 20 6. Baculovirus recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un baculovirus exprimant une protéine d'enveloppe autre que celle des baculovirus.
7. Baculovirus selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine d'enveloppe est la glycoprotéine du virus de la rage ou la glycoprotéine de VSV (Vesicular Stomatitis Virus).
8. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il
25 comprend également des séquences promotrices permettant l'expression de la séquence d'acides nucléiques hétérologue.

9. Baculovirus selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séquence promotrice est choisie parmi les promoteurs des gènes NSE (Neuron Specific Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine Hydroxylase), DAT (Dopamine Transporter), ChAT (Choline Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH (Tryptophane Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid Deshydrogenase), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).
10. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend également des séquences signal permettant d'induire une sécrétion du produit thérapeutique.
11. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 10 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies du système nerveux.
12. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 11, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
13. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique choisi parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.
14. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5 et NT6, les membres de la famille du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF, l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, et le TGF- β .
15. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que le gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique est le gène codant pour la β -glucuronidase

16. Population de cellules du système nerveux humain (e.g. cerveau, moelle épinière, cellules neurales, gliales, épendymales), infectée par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10.
17. Implant comprenant des cellules humaines infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10.
18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
19. Utilisation de cellules infectées ex vivo par un baculovirus recombinant comprenant un acide nucléique hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique, pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation in vivo.
20. Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que les cellules sont encapsidées dans un système inerte.
21. Utilisation d'un baculovirus recombinant comprenant un acide nucléique hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique, pour la préparation d'une composition destinée au transfert dudit produit dans le système nerveux in vivo par administration intramusculaire et transport rétrograde.
22. Utilisation d'un baculovirus recombinant ayant une protéine d'enveloppe de baculovirus et comprenant un acide nucléique hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique, pour la préparation d'une composition destinée à l'administration in vivo.

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST 98023	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 01813	Date du dépôt international (jour/mois/année) 23/07/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 24/07/1998
Déposant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

VECTEURS DERIVES DE BACULORIVUS ET UTILISATION POUR LE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES NERVEUSES DES VERTEBRES

5. En ce qui concerne l'abrégé,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

8/12/98

09/744488

500 Re PCT/PTO 24 JAN 2001

NOUVEAUX VECTEURS DERIVES DE BACULOVIRUS ET UTILISATION POUR LE
TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES NERVEUSES DES
VERTEBRES

L'invention concerne de nouveaux virus recombinants et leur utilisation pour
5 le transfert de gènes dans les cellules du système nerveux des vertébrés. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant lesdits virus recombinants. Plus particulièrement la présente invention concerne de nouveaux vecteurs dérivés des baculovirus et leur utilisation pour le traitement des maladies du système nerveux des vertébrés.

10 Les baculovirus sont des virus enveloppés à ADN bicaténaire circulaire spécifiques d'invertébrés. Leur prototype, AcNPV (*autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus), a un génome de 133 kb. Ce vecteur est très largement utilisé comme vecteur d'expression de gènes eucaryotes en cellules d'insectes, à partir de deux promoteurs forts [polyédrine (Ph) et P10], (King et Possee, The baculovirus
15 expression system. London: Chapman&Hall, 1992.).

Des stocks de baculovirus peuvent être préparés par infection de cellules d'insectes (Sf9 ou Sf21) par le baculovirus recombinant. La production de protéine se fait par infection des cellules d'insecte avec le baculovirus: le milieu cellulaire est récolté et la protéine synthétisée *in vitro* dans les cellules d'insecte est extraite.

20 Les baculovirus recombinants sont obtenus par recombinaison homologue dans des cellules d'insectes (généralement Sf9 ou Sf21) entre le plasmide navette contenant le transgène sous contrôle d'un promoteur actif dans les cellules de vertébrés et le génome du baculovirus linéarisé au niveau du site de recombinaison, ou par d'autres techniques bien connues de l'homme du métier (transposons, recombinaison en
25 levure...). Les baculovirus sont des virus épisomaux (chez l'insecte), et permettent d'y intégrer jusqu'à 100 kb d'ADN recombinant. Ainsi ils présentent de nombreux avantages liés à leur facilité de production (multiplication en cellules d'insectes, conditions de culture industrialisables, obtention de titres élevés), à leur capacité de clonage importante, et au fait qu'il présentent un faible risque de dissémination car ils

sont ni réplicatifs chez les mammifères ni disséminatifs chez les insectes. Ces vecteurs n'ont cependant pas été utilisés dans le domaine de la thérapie génique, car d'une part et jusqu'à très récemment il était admis que ces virus n'infectaient pas les cellules de mammifères, et d'autre part la transfection de Baculovirus *in vivo* chez les mammifères n'a encore jamais été mise en évidence.

Hoffmann et al. (PNAS USA 92 (1995) 10099-10103) ont montré qu'un baculovirus recombinant contenant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur précoce de CMV est capable d'infecter et d'exprimer le transgène dans des hépatocytes avec une très bonne efficacité : humains (culture primaire, lignée Huh7 et HepG2) et murins (culture primaire de lapin). Cependant ces auteurs n'ont pas observé d'expression significative du transgène dans toute une série de lignées provenant d'origines diverses, y compris du système nerveux (neuroblastome de souris Neuro-2a, astrocytome humain SW1088 et pheochromocytome de rat PC12).

Boyce F.M. et Bucher N.L.R. PNAS USA 93 2348-2352 (1996) ont obtenu une expression significative du gène LacZ placé sous contrôle d'un promoteur RSV dans la lignée HepG2 ainsi que dans les lignées 293 (rein humain), A549 (poumon humain) et PC12 (pheochromocytome de rat). Ils n'ont pas obtenu d'expression significative dans toutes les autres lignées testées,

Sandig V. et al. (Human Gene therapy 7 1937-1945 (1996)) ont utilisé un baculovirus recombinant RSV-LacZ pour l'infection d'hépatocytes humains et murins. Ils ont montré que le virus est sensible au complément et ne peut donc pas infecter *in vivo* le foie. Ils ont obtenu cependant une infection d'un morceau de foie humain perfusé *ex vivo* par le baculovirus, après élimination du sérum.

Plus récemment, Shoji et al. (J. Gen. Virol. 1997) ont utilisé un baculovirus recombinant contenant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur CAG (enhancer précoce du CMV et promoteur de la β -actine de poulet), et ont obtenu une expression significative dans différentes lignées cellulaires (HepG2, Huh7, CPK,

Cos7, Hela, FS-L3 KATO-III). Une faible expression a été détectée dans les lignées RGM-1, PC12, IMR-32 et MT-2.

Barsoum et al (Human Gene Therapy, 8 2011-2018 (1997)) ont montré qu'il était possible de modifier l'enveloppe virale d'un baculovirus contenant une cassette
5 d'expression de la β -galactosidase sous contrôle du LTR de RSV. Ceci permet d'améliorer le potentiel de transduction de ces vecteurs, en améliorant l'infection des cellules infectables par le baculovirus dont l'enveloppe n'est pas modifiée. Ceci permet également d'infecter des cellules qui n'étaient pas infectables par le baculovirus dont l'enveloppe n'était pas modifiée. Cependant, les auteurs n'ont pas
10 testé l'infection de cellules nerveuses. De plus, ils n'ont pas réussi à transduire les cellules Neuro2a (ou N2a) qui sont issues d'un neuroblastome de souris.

Ainsi jusqu'à présent aucun vecteur baculovirus n'a été utilisé pour le transfert de gènes *in vitro* ou *in vivo* dans les cellules du tissu nerveux. En effet, seule la lignée PC12, pouvant présenter dans des conditions particulières un phénotype
15 "pseudo-neuronal" (phechromocytome de rat : système nerveux périphérique), s'est révélée pouvoir être infectée par le baculovirus, cependant le niveau d'expression restait très faiblement supérieur à celui du contrôle. Enfin, aucune utilisation du baculovirus pour le transfert de gène *in vivo* chez les mammifères n'a été décrite jusqu'à présent.

20 La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des baculovirus recombinants comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant préférentiellement pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux, d'administrer ces baculovirus recombinants *in vivo*, et que cette administration permet une expression stable et localisée du transgène *in vivo*, et en particulier dans le système nerveux. En effet, les résultats
25 présentés dans les exemples démontrent que les baculovirus de l'invention peuvent infecter et diriger l'expression de transgène dans les cellules du système nerveux de vertébrés et préférentiellement de l'humain. A titre illustratif de l'invention, les

exemples de la présentent demande, rapportent de manière surprenante l'expression d'un transgène d'intérêt dans au moins 60 % de cellules d'une culture primaire de télencéphale humain différenciées et/ou une expression dans au moins 30 % de cellules télencéphaliques progénitrices ainsi que 30% d'astrocytes d'une culture primaire d'un cortex humain adulte. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression de transgènes d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans le système nerveux ou pour une application *ex vivo* pour le transfert de gènes dans des cultures de cellules du système nerveux ou autre (cellules de Sertoli, cellules musculaires...) destinées à être greffées. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives ou le traitement de maladies métaboliques nécessitant un traitement spécifique du système nerveux en raison de la faible accessibilité des agents thérapeutiques qui ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique.

Un premier objet de l'invention réside dans des baculovirus recombinants comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux.

En particulier, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques.

Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tout gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer

ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule lui permettant de lutter contre une pathologie, ou encore inhiber l'expression d'une protéine dans les cellules, par l'utilisation de mutants négatifs par exemple.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, en particulier neurotrophiques pour le traitement des maladies neurodégénératives, des traumatismes ayant endommagé le système nerveux, ou des dégénérescences rétinienne. Par exemple les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6 et leurs dérivés, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF et leurs dérivés, l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF et ses dérivés, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 leurs dérivés, et le TGF- β .

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut également citer les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes suicides : thymidine kinase, cytosine désaminase, etc.,

Les séquences d'acides nucléiques codant pour des produits d'intérêt thérapeutique au sens de la présente invention recouvrent également les gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et des autres constituants de la cellule.

On peut ainsi citer de manière non limitative les gènes associés aux maladies du métabolisme des carbohydrates comme par exemple fructose-1-phosphate aldolase, fructose-1,6-diphosphatase, glucose-6-phosphatase, α -1,4-glucosidase lysosomale, amylo-1,6-glucosidase, amylo-(1,4 : 1,6)-transglucosidase, phosphorylase musculaire,

phosphofructokinase musculaire, phosphorylase-b-kinase, galactose-1-phosphate uridyl transférase, toutes les enzymes du complexe pyruvate déshydrogénase, pyruvate carboxylase, 2-oxoglutarate glyoxylase carboxylase, D-glycérate déshydrogénase.

5 On peut également citer :

- les gènes associés avec des maladies du métabolisme des amino-acides comme par exemple phénylalanine hydroxylase, dihydrobioptérine synthétase, tyrosine aminotransférase, tyrosinase, histidinase, fumarylacéto-acétase, glutathion synthétase, γ -glutamylcystéine synthétase, ornithine- δ -aminotransférase, carbamoylphosphate synthétase, ornithine carbamoyltransférase, argininosuccinate synthétase, argininosuccinate lyase, arginase, L-lysine déshydrogénase, L-lysine kétoglutarate réductase, valine transaminase, leucine isoleucine transaminase, décarboxylase des 2-céto-acides à chaîne ramifiée, isovaléryl-CoA déshydrogénase, acyl-CoA déshydrogénase, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase, acétoacétyl-CoA 3-kéthiolase, propionyl-CoA carboxylase, méthylmalonyl-CoA mutase, ATP :cobalamine adénosyltransférase, dihydrofolate réductase, méthylène tétrahydrofolate réductase, cystathionine β -synthétase, le complexe sarcosine déshydrogénase, les protéines appartenant au système de clivage de la glycine, β -alanine transaminase, carnosinase sérique, homocarnosinase cérébrale.

20 - Les gènes associés avec des maladies du métabolisme des graisses et des acides gras, comme par exemple lipoprotéine lipase, apolipoprotéine C-II, apolipoprotéine E, d'autres apolipoprotéines, lécithine cholestérolacyltransférase, récepteur des LDL, stérol hydroxylase du foie, « acide phytanique » α -hydroxylase.

- Les gènes associés avec des déficiences lysosomales, comme par exemple α -L-iduronidase lysosomale, iduronate sulfatase lysosomale, héparan N-sulfatase lysosomale, N-acétayl- α -D-glucosaminidase lysosomale, acétyl-CoA : α -glucosamine N-acétyltransférase lysosomale, N-acétyl- α -D-glucosamine 6-sulfatase lysosomale, galactosamine 6-sulfate sulfatase lysosomale, β -galactosidase lysosomale,

arylsulfatase B lysosomale, β -glucuronidase lysosomale, N-acétylglucosaminyl-phosphotransférase, α -D-mannosidase lysosomale, α -neuraminidase lysosomale, aspartylglycosaminidase lysosomale, α -L-fucosidase lysosomale, lipase acide lysosomale, céramidase acide lysosomale, sphingomyelinase lysosomale, glucocérébrosidase lysosomale et galactocérébrosidase lysosomale, galactosylcéramidase lysosomale, arylsulfatase A lysosomale, α -galactosidase A, β -galactosidase acide lysosomale, chaîne α de l'hexosaminidase A lysosomale.

On peut également citer, de façon non restrictive, les gènes associés avec des maladies du métabolisme des stéroïdes et des lipides, les gènes associés avec des maladies du métabolisme des purines et des pyrimidines, ainsi que les gènes associés à des maladies du métabolisme de la porphyrine et de l'hème.

La séquence d'acides nucléiques hétérologue peut être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308, en ARN autocatalytiques tels que les ribozymes ainsi qu'en ARN modifiant l'épissage en trans.

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée. Il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. Avantagusement, il s'agit d'un promoteur actif dans les cellules ou tissus nerveux, notamment d'un promoteur eucaryote. A cet égard, il peut s'agir par exemple d'un

promoteur ubiquitaire, c'est-à-dire fonctionnel dans la majorité des types cellulaires. Encore plus préférentiellement, il s'agit donc d'un promoteur ubiquitaire eucaryote. Le promoteur peut être autologue, c'est-à-dire provenant de la même espèce que la cellule dans laquelle l'expression est recherchée ou xénogénique (provenant d'une autre espèce). On peut citer à titre d'exemples avantageux des promoteurs ubiquitaires eucaryotes des promoteurs forts tels que le promoteur du gène de la phosphoglycerate kinase 1 (PGK) ou d'autres promoteurs dirigeant l'expression des gènes du métabolisme cellulaire obligatoire (ces gènes sont dits "domestiques" ou "de ménage" et spécifient des protéines nécessaires à des fonctions communes à toutes les cellules). Il s'agit par exemple de gènes intervenant dans le cycle de Krebs, dans la respiration cellulaire ou encore dans la réplication ou la transcription ou la traduction (EF1- α). On peut citer comme exemples particuliers de ce type de promoteurs, le promoteur des gènes α 1-antitrypsine, β -actine, vimentine, aldolase A ou Efl α (facteur d'élongation).

Le promoteur utilisé dans le cadre de l'invention peut encore être un promoteur eucaryote spécifique des cellules nerveuses. On peut citer à titre d'exemple le promoteur des gènes NSE (Neuron Specific Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine Hydroxylase), DAT (Dopamine Transporter), ChAT (Choline Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH (Tryptophane Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid Deshydrogenase), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et, plus généralement, tous les promoteurs des enzymes de synthèse ou des transporteurs des neuromédiateurs ou tout autre promoteur de gènes dont l'expression est spécifique d'un type ou sous-type neuronal ou glial donné.

On peut également envisager l'utilisation de promoteurs viraux, tels que par exemple les promoteurs CMV (Cytomégalo virus), RSV (Rous Sarcoma Virus), TK (Thymidine Kinase), SV40 (Simian Virus) et LTR (Long Terminal Repeat) de RSV, de MLV (Murine Leukaemia Virus) ou de HIV (Human Immunodeficiency Virus).

Il est également envisageable d'utiliser des promoteurs chimériques tels que CAG (enhancer de CMV et promoteur de la β -actine de poulet), NRSE-PGK ou des promoteurs inductibles tels que les promoteurs inductibles par la tétracycline (Tet-On et Tet-Off), les promoteurs inductibles à l'ecdysone, ou encore d'autres promoteurs inductibles (RU486, 17 β -Oestradiol...) et notamment des promoteurs inductibles par le stress, tel que le stress thermique (hsp70)

En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également comporter, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible ou dans un compartiment spécifique de la cellule. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Le virus peut être utilisé aussi bien dans une approche *ex vivo* ou *in vivo*. Dans le cadre d'une thérapie génique applicable à l'homme, on peut envisager une approche *ex vivo* par greffe de cellules modifiées génétiquement par un baculovirus recombinant. Ces cellules peuvent être d'origines diverses: nerveuses (humaines ou non humaines), cellules de Sertoli, cellules chromaffines..... L'association de certains médicaments peut être envisagée en vue notamment de d'améliorer le maintien de la greffe ou l'expression du transgène (immunosuppresseurs, anti-complément...). On peut aussi envisager l'implantation de cellules génétiquement modifiées par un baculovirus recombinant après encapsidation dans un système inerte.

Les baculovirus selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier. En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un plasmide navette et le génome de *Autographa californica* dans les cellules Sf9 et amplifié dans ces mêmes cellules selon la méthode

décrite par Gruenwald S. et Heitz J., 1993 (Baculovirus expression vector system, procedure & method manual. Pharmingen Eds, San Diego, CA). Ensuite les baculovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire comme illustré dans les exemples.

- 5 Les baculovirus de l'invention s'étendent à tout dérivé d'un baculovirus tel que décrit et produit précédemment. Par dérivé, il faut entendre tout baculovirus ayant son génome modifié soit par insertion de séquences soit par délétion de gènes viraux dans ledit génome. En particulier, les dérivés des baculovirus sont obtenus par délétion de tout ou partie d'un ou plusieurs gènes viraux. A titre d'exemple, on peut citer la
- 10 délétion du gène de la polyhedrine, du gène P10 ainsi que de tout gène non indispensable pour la répllication du baculovirus en cellules d'insecte notamment. Un dérivé particulier est représenté par la délétion de tous les gènes viraux du baculovirus (virus gutless) permettant l'insertion d'une cassette d'expression de grande taille.

- Il est également possible de modifier l'enveloppe des baculovirus, c'est-à-dire
- 15 de faire exprimer une protéine d'enveloppe autre que celles des baculovirus à la surface de ceux-ci, permettant ainsi de modifier le spectre d'hôte du virus. On peut ainsi utiliser des enveloppes qui permettent d'élargir le spectre d'hôtes à une très large variété de types cellulaires ou l'on peut au contraire envisager de restreindre le spectre d'hôtes à un type spécifique de cellules nerveuses. Parmi les protéines d'enveloppe
- 20 utilisables on peut citer notamment : la glycoprotéine de VSV, la protéine d'enveloppe amphotrope de MLV. On peut également utiliser des protéines d'enveloppes qui permettent d'améliorer spécifiquement l'entrée du virus dans les cellules neurales (CNS et/ou PNS) telles que la glycoprotéine de rhabdovirus et notamment du virus de la rage, la glycoprotéine d'enveloppe de togavirus (alphavirus
- 25 dont Semliki Forest et Sindbis virus, et rubivirus) et notamment de la rubéole (rubivirus), la glycoprotéine des Herpès virus (HSV), ou tout autre virus neurotrope. Des variantes préférés de baculovirus recombinants selon l'invention sont des baculovirus pseudotypés par la glycoprotéine du virus de la rage (Rabies Virus) ou la glycoprotéine de VSV (Vesicular Stomatitis Virus).

Ces vecteurs recombinants peuvent être utilisés pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules des tissus nerveux *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

5 L'application *in vivo* pourra être faite notamment par injection stéréotaxique du baculovirus recombinant dans le système nerveux central (cerveau, moelle) et notamment dans le parenchyme ou bien dans les espaces contenant le liquide
céphalorachidien (intraventriculaire ou intrathécal par exemple). A cet égard, il est possible d'utiliser l'association d'inhibiteurs du complément (CVF, sCR1 (Hoffman et al., Gene therapy, 1998, vol.5, pp531-536), FUT175...) pour améliorer l'efficacité de la
transfection. Il est également envisageable de réaliser l'administration du baculovirus,
10 notamment au niveau du muscle, afin d'atteindre le système nerveux par transport rétrograde du baculovirus et/ou du produit thérapeutique. Dans ce dernier cas, l'injection sera avantageusement précédée par une inhibition du système du complément *in vivo*.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne également toute
15 utilisation d'un baculovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies du système nerveux. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces baculovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie
20 d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie de la sclérose en plaque ou d'autres maladies affectant la myélinisation, ainsi que les maladies affectant le métabolisme telles que les maladies lysosomiales et notamment la maladie MPS VII ou syndrome de Sly.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique
25 comprenant un ou plusieurs baculovirus recombinants tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par différentes voies et notamment par voie intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intra-cérébrale, intra-ventriculaire, intra-médullaire, etc.

De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique.

5 L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

10

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies du système nerveux, telles que par exemple les maladies neurodégénératives ou métaboliques, comprenant l'administration à un patient d'un baculovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une

15 méthode de traitement des maladies neurodégénératives et/ou lysosomiales comprenant l'administration stéréotaxique d'un baculovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les baculovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond

20 au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire d'insecte, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de plages de cellules infectées ou bien en titration par dilution limite. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

25

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs baculovirus recombinants tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules nerveuses humaines infectée par ces baculovirus. Il peut s'agir en particulier de cellules gliales (astrocytaire, microgliale, oligodendrocyte, cellule de Schwann), épendymales, neurales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de greffes autologues, il peut s'agir de cellules astrocytaires de préférence humaines adultes. S'agissant des greffes hétérologues, il peut s'agir de cellules embryonnaires de préférence humaines, de cellules progénitrices nerveuses ou neuronales telles que les progéniteurs issus de télencéphale ou de mésencéphale humain pouvant éventuellement différenciés *in vitro* avant la greffe, des astrocytes embryonnaires ; ces cellules pouvant être aisément obtenues à partir de biopsies. Il peut s'agir également de xéngreffes issues de phéochromocytomes, ou de cellules embryonnaires ou d'astrocytes ou encore d'autres types cellulaires tels que les cellules de Sertoli. Les cellules peuvent également être des cellules ES (Embryonic Stem cells) de préférence humaines, différenciées dans une voie nerveuses par exemple. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les baculovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des baculovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire une substance d'intérêt thérapeutique. L'infection est réalisée *in vitro* selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien

entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses de baculovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-

5 avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules humaines infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^4 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en-

10 comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de

15 gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le

20 cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant

25 l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non

toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée dans un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des maladies du système nerveux. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS, ou encore les maladies lysosomiales. Les baculovirus selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur faible immunogénicité, en raison de l'absence d'expression des protéines du baculovirus dans les cellules de mammifères.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

MATERIELS ET METHODES

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au

phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

LEGENDE DES FIGURES

- 5 Figure 1 : Pourcentage de cellules GFP positives et conservées à l'état indifférentié par ajout de bFGF dans le milieu, en fonction de la quantité de baculovirus Bac-CMV-GFP (1 μ l correspondant à une MOI de 5).

- 10 Figure 2 : Pourcentage de cellules GFP positives et cultivées en présence de 10 % de sérum (état différencié), en fonction de la quantité de baculovirus Bac-CMV-GFP (1 μ l correspondant à une MOI de 5).

Figure 3 : Comparaison et mise en évidence de l'action du butyrate dans plusieurs lignées cellulaires : CHP-212, Hela, Cos 7. L'infection et l'expression est très significative notamment dans les cellules CHP-212. L'ajout de butyrate permet une expression de GFP dans pratiquement 100% de ces cellules.

- 15 Figure 4 : Mise en évidence de l'action du butyrate sur l'infection de cellules progénitrices cultivées en présence de 10 % de SFV 48 heures après l'infection :

4A : action du butyrate exprimée en pourcentage de cellules GFP positives. 48 heures après l'infection, plus de 60 % des cellules expriment la GFP.

- 20 - 4B : action du butyrate exprimée en intensité de fluorescence. 48 heures après l'infection, l'intensité de fluorescence est très supérieure, dans les cellules soumises à l'action du butyrate (intensité d'environ 425 avec butyrate versus une intensité égale à 100 sans butyrate).

Figure 5 : Résultats de l'expression *in vitro* de GFP après infection par Bac-CMV-GFP d'une culture de cellules télencéphalique embryonnaires humaines :

- 5A : culture de cellules télencéphalique embryonnaires humaines avec 10 % de SVF. La très grande majorité de ces cellules sont des astrocytes.

- 5B : culture de cellules télencéphalique embryonnaires humaines avec 10 % de SVF et butyrate. Toutes les cellules expriment la GFP..

5 Figure 6 : Résultats de l'expression de la GFP *in vivo* une semaine après injection stéréotaxique chez la souris Balb C du baculovirus bac-CMV-GFP :

- 6A : expression de la GFP dans le striatum. Morphologiquement, les cellules marquées semblent être des cellules épithéliales de vaisseau sanguin ainsi que quelques cellules nerveuses (astrocytes) entourant le vaisseau sanguin.

10 - 6B : expression de la GFP dans le striatum. Les cellules marquées sont des astrocytes.

- 6C : expression de la GFP dans le ventricule latéral. Les cellules marquées sont des cellules épendymaires.

15 Figure 7 : Résultats dans le striatum de l'expression de la GFP *in vivo* 48 heures après injection stéréotaxique chez le rat, du baculovirus bac-CMV-GFP . L'injection a été réalisée dans les mêmes conditions que décrites dans l'exemple 4 (9 µl de virus dilué à 1:10). Le marquage de l'expression de la GFP a été réalisé au moyen d'un anticorps anti-GFP (Clontech).

EXEMPLES

20

Exemple 1 : construction de différents vecteurs baculovirus

1.1 - Construction et production du Baculovirus RSV-LacZ:

Le baculovirus recombinant RSV-LacZ a été obtenu par recombinaison homologue entre un plasmide navette et le génome de *Autographa californica* dans les

cellules Sf9 et amplifié dans ces mêmes cellules selon la méthode décrite par Gruenwald S. et Heitz J., 1993 (Baculovirus expression vector system, procedure & method manual. Pharmingen Eds, San Diego, CA).

5 Le plasmide navette a été élaboré par insertion dans le plasmide pVL1392 (Pharmingen, San Diego, CA) d'une cassette d'expression du gène de la *beta*-galactosidase nucléaire sous contrôle du LTR de RSV, et du signal de polyadénylation de SV40 en aval du gène LacZ. Cette cassette d'expression a été insérée dans le site multiple de clonage en orientation inverse par rapport au promoteur de la polyhédrine contenu dans le plasmide pVL1392.

10 Le virus est ensuite produit par amplification dans des cellules Sf9. Il est concentré par ultracentrifugation de 180 ml de surnageant (titré initialement à 3×10^7 pfu/ml) à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes dans un rotor SW 28, puis repris dans 2ml de PBS, ultracentrifugé à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes dans un rotor SW 41 dans un gradient de saccharose (10% à 60%, en PBS). La bande blanche
15 correspondant aux particules virales purifiées est prélevée et resuspendue dans du PBS et ultracentrifugée à 25.000 t/min à 4°C pendant 90 minutes. Le culot est resuspendu dans 1,5 ml de PBS froid. Ce stock de virus concentré et purifié est conservé à 4°C ou à -80 ° C.

1.2 - Construction et production du Baculovirus CAG-LacZ:

20 Le baculovirus recombinant CAG-LacZ a été obtenu en utilisant le plasmide navette pAcYM1 (Matsuura et al, J. of Gen. Virol. 68 (1987) 1233-1250). Une cassette d'expression contenant le promoteur CAG contrôlant l'expression du gène LacZ a été insérée dans le plasmide navette. Le promoteur CAG est un promoteur composite consistant en un enhancer CMV IE, le promoteur de la *beta*-actine de
25 poulet et le signal de polyadénylation de la *beta*-globine de lapin.

Le baculovirus recombinant a été obtenu par recombinaison homologue dans les cellules Sf9, puis amplifié dans ces cellules (selon le protocole de Matsuura et al., J. of Gen. Virol. 68 (1987) 1233-1250).

5 Le virus utilisé a été obtenu par amplification d'un aliquot du baculovirus recombinant dans les cellules Sf9. La solution virale est titrée à 1×10^9 pfu/ml. Le virus est ensuite concentré d'un facteur 100 et purifié dans les mêmes conditions que celles décrites pour le baculovirus RSV-LacZ.

1.3 Construction et production du Baculovirus CMV-GFP

10 Cet exemple a pour but de décrire la construction d'un baculovirus recombinant, véhiculant une cassette d'expression très active, clonée à partir du vecteur pCI vector (Promega) et incluant le gene de la Green Fluorescent Protein (EGFP), clonée à partir du plasmide EGFP (Clontech), sous contrôle d'un promoteur CMV et un intron chimérique (comprenant le site d'épissage 5' de l'intron de la β -globine et le site 3' d'épissage d'un intron IgG par exemple) placé en amont du
15 transgène et un polyA de SV 40.

Tout d'abord, un plasmide navette Bac-CMV contenant une cassette d'expresssion comprenant le promoteur précoce du CMV, le signal tardif de polyadénylation de SV40 et un site multiple de clonage a été construit afin de pouvoir cloner tout ADNc pour l'expression de ce dernier en cellules de mammifères.
20 Initialement, la cassette a été clonée dans un vecteur pVL1392 (Invitrogene), en orientation inverse du promoteur de la polyhedrine afin de prévenir toute interférence de transcription avec la promoteur de la polyhedrine du baculovirus. Le gène reporter GFP a été cloné dans le plasmide navette (Bac-CMV) pour produire le plasmide Bac-CMV-GFP.

25 Ce plasmide navette a ensuite été transfecté en cellules d'insecte Sf9 pour la production des baculovirus recombinants, par recombinaison homologue avec le génome linéarisé de *Autographa californica* (AcNPV). Lorsque le virus a été amplifié

sur cellules d'insecte Sf9, l'expression de la GFP a pu être détectée en microscopie de fluorescence, démontrant ainsi que le promoteur CMV était actif dans ces cellules.

Après amplification, le stock viral (Bac. CMV-GFP) a été successivement concentré et purifié selon les méthodes décrites précédemment. Les aliquots ont été
5 conservés à - 80 ° C.

Exemple 2 : test de l'infection *in vitro* de différentes cultures cellulaires par le baculovirus RSV-LacZ

2.1 - Infection des cultures primaires d'astrocytes adultes:

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 4 puits. L'infection se fait à 37°C
10 dans du milieu de culture sans sérum pendant 2 h environ. Elle a été faite avec des concentrations croissantes de virus recombinant. Après 24 h les cellules sont fixées (PFA 4%) et colorées par du X-Gal. Les contrôles non infectés ne présentent pas de cellule bleue.

L'observation des cultures à 24 et 48 heures après l'infection montre que le
15 baculovirus recombinant est capable d'infecter des cellules d'une culture primaire d'astrocytes humains (télencéphale humain cultivé en bFGF) et d'exprimer le gène LacZ (observé par réaction X-Gal).

2.2 - Infection des cultures primaires de télencéphale embryonnaire humain:

Les cellules sont cultivées en milieu contenant du bFGF (milieu permettant de
20 les maintenir dans un état de cellules progénitrices non ou très peu différenciées). L'infection a été faite dans le milieu de culture complet pendant 2 h. Les contrôles non infectés ne présentent pas de cellules bleues.

L'observation des cultures quatre jours après l'infection montre que le
25 baculovirus recombinant est capable d'infecter des cellules progénitrices nerveuses

humaines (télencéphale humain cultivé en bFGF) et d'exprimer le gène LacZ (observé par réaction X-Gal).

L'ensemble de ces résultats démontrent que les vecteurs recombinants dérivés des baculovirus sont capables d'infecter différents types de cultures primaires de cellules neurales *in vitro* et peuvent être ainsi utilisés comme vecteur de thérapie génique pour le transfert de gènes *ex vivo*.

Exemple 3 : test de l'infection *in vitro* de différentes cultures cellulaires par le baculovirus Bac-CMV-GFP

3.1 infection de différentes lignées cellulaires

10 Afin d'apprécier l'efficacité du vecteur Bac-CMV-GFP pour le transfert de gène dans les cellules de mammifères, l'activité potentielle de ce vecteur à infecter et à diriger l'expression du gène reporter GFP dans différentes lignées neuronales (CHP212) et non neuronale (HuH7, 293, HeLa, Cos7) a été étudiée. Pour cela, les lignées de cellules HuH7 (hépatocytes humains), 293 (reins humains), HeLa (épithélium
15 humain), Cos7 (rein de singe), N2A (cellules de neuroblastome murin) et CHP212 (cellules de neuroblastome humain) ont été infectées par ce vecteur à une MOI de 12,5. A cette concentration de vecteur, l'analyse des cellules fluorescentes par cytométrie de flux, permet de constater que près de 100 % des cellules HuH7 et 293 sont transduites, ainsi qu'une forte proportion des cellules CHP212 et dans une
20 moindre mesure des cellules HeLa, Cos7 et N2A (de l'ordre de 5 à 20 %).

Afin de documenter les phénomènes de repression transcriptionnelle de ses vecteurs, les cellules transduites ont été traitées par un inhibiteur des déacétylases des histones (butyrate). En effet, cet agent est décrit comme un puissant facteur capable de lever les inhibitions de la transcription dues à la condensation de la chromatine. Ainsi, dans
25 chaque cas, une augmentation significative du nombre de cellules exprimant le transgène a pu être montrée. De la même manière, une forte augmentation de la quantité de fluorescence par cellules après induction au butyrate a été enregistrée.

Ces expériences montrent la capacité de ce vecteur à transduire efficacement un large éventail de cellules de mammifères. En outre, il a été observé que ce vecteur permet de transduire très efficacement une lignée neuronale humaine (CHP212).

3.2 Infection de cultures primaires de cellules nerveuses in vitro

- 5 De la même façon que pour les lignées cellulaires, le vecteur Bac-CMV-GFP a été utilisé pour transduire des cellules nerveuses primaires de rongeur ou humaines.

Initialement des cellules progénitrices neuroépithéliales primaires humaines ont été infectées et cultivées en milieu contenant du bFGF (état progéniteur) ou bien cultivées en présence de serum (cellules différenciées majoritairement dans la voie gliale), avec
 10 une gamme croissante de vecteur jusqu'à une quantité correspondant à une MOI de 25. Deux jour après l'infection, l'analyse par cytométrie de flux révèle la présence de l'ordre de 30 % de cellules progénitrice-bFGF et de l'ordre de 60 % de cellules progéniteurs différenciés, exprimant la GFP comme le montrent respectivement les figures 1 et 2 . Il est intéressant de remarquer que la courbe dose/réponse dans le cas
 15 des cellules progénitrices n'a pas atteint de plateau à une MOI de 25, suggérant que ces cellules peuvent être infectées de manière plus importante.

Par ailleurs, des expériences de double marquage *in vitro* sur les cellules humaines du télencéphale embryonnaire à l'aide des marqueurs GFAP (marqueur des astrocytes) et MAP 5 (marqueurs des neurones) montrent nettement que ces deux types cellulaires
 20 sont infectables. En effets, les résultats fournissent un marquage GFAP/GFP et MAP5/GFP démontrant de manière inattendue que non seulement les astrocytes mais également les neurones sont infectés.

En parallèle, sur les mêmes cellules il a été vérifié que le taux de "pseudotransduction" c'est-à-dire que le nombre de cellules GFP+ qui n'ont synthétisé
 25 de novo de nouvelles du gène reporter était dans tout les cas inférieur à 3 % des cellules GFP positives. Pour cela, la présence d'une fluorescence a été recherchée, trois heures après l'infection, durée qui ne permet pas une expression effective de la

GFP suivant le mécanisme de transcription et traduction du gène de la GFP (figures 4A et 4B). De plus, l'inactivation des virus par irradiation aux UV (avec un UV-cross-linker à une dose de 100 000 μ joules environ) avant l'infection a permis de montrer qu'il n'y avait quasiment plus (moins de 3%) de cellules GFP positives, confirmant
 5 donc les résultats obtenus en pseudotransduction.

L'effet du butyrate a été également évalué sur des cellules gliales obtenues par différenciation de cultures de progéniteurs nerveux humains, infectés par Bac-CMV-GFP. Vingt-quatre heures après supplémentation de l'inducteur dans le milieu de culture, un doublement du nombre de cellules GFP positives par rapport aux cellules
 10 non traitées a été observé. La valeur moyenne de fluorescence dans les cellules traitées, était cependant, environ quatre fois supérieur à celle observée dans les cellules non traitées. Ces données suggèrent fortement un mécanisme épigénétique de repression transcriptionnelle de la même manière que décrit précédemment pour les lignées cellulaires. Ces résultats montrent en outre que le vecteur de l'invention
 15 permet d'infecter des astrocytes primaires humains adultes, ainsi que des pinéaloctes primaire de rat.

Cet exemple démontre donc qu'un baculovirus contenant une cassette d'expression comprenant un promoteur (CMV) et un gène hétérologue (GFP) est capable d'infecter des cellules non neuronales mais également et de manière surprenante, des cellules
 20 neuronales (lignée CHP212) ainsi que des cellules nerveuses issues de cultures primaires (embryonnaires ou adultes) et de diriger l'expression du gène hétérologue dans lesdites cellules à un taux très significatif.

Exemple 4 : Test in vivo avec le baculovirus RSV-LacZ

4.1 - Injection stéréotaxique dans le striatum de rat:

25 Des rats femelles adultes Sprague-Dowley ont été injectées avec 9 μ l de virus RSV-LacZ concentré. L'injection a été faite par injection lente de 1 μ l de virus (0,25 μ l/min) dans trois sites d'injections avec 3 sous-sites pour chacun des sites.

Coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma :

A: +1,8 , L: + 2,5 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

A: +0,6 , L: + 3,2 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

A: + 0,6 , L: +2 , V0: -5 , V1: -4,6 , V2: -4,2

- 5 5 jours après l'infection, les rats sont fixés par perfusion intracardiale de PFA 4% en PBS et les cerveaux post-fixés pendant 24 h à 4°C dans du PFA 4%. Les cerveaux sont ensuite cryoprotégés par immersion dans du saccharose 15% dans du PBS pendant 72h. Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane froid (-50°C) et préservés à - 80°C.

10 4.2 - Histologie sur les cerveaux des rats injectés:

- 15 Les cerveaux sont coupés au niveau du striatum au cryostat (épaisseur de coupe: 20 µm). Les coupes sont étudiées en immunohistochimie pour détecter la présence de β -galactosidase d'*E coli*. Les lames sont lavées en PBS, incubées en méthanol + H₂O₂ 0,3% pendant 1 heure, lavées en PBS, puis préincubées pendant 2 h
- 20 avec du PBS + 10% SVF + 0,1% de Triton. Ensuite elles sont incubées toute la nuit avec de l'anticorps anti- β -Gal (Cappel: 1:5000ème), lavées avec du PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire (Kit Vectastain Goat Anti-Rabbit). La révélation est faite en DAB + Nickel. Ainsi un grand nombre de cellules marquées a été observé dans les deux cerveaux (sur environ 100 coupes, faisant une épaisseur d'environ 2 mm autour du point d'injection).

Un double-marquage fluorescent β -Gal + GFAP a été fait en utilisant un anticorps monoclonal anti- β -Gal (Promega) et un anticorps anti-GFAP polyclonal. Très peu de cellules sont doublement marquées.

- 25 On observe une transduction et un marquage plus prononcé des cellules à la périphérie du corps calleux ainsi que cellules dans le striatum.

L'étude par immunohistochimie avec l'anticorps anti- β Gal démontre que le baculovirus recombinant permet l'infection et l'expression du transgène dans un grand

nombre de cellules nerveuses. Elle montre aussi que le baculovirus recombinant n'est pas inactivé par le complément dans le CNS.

Exemple 5 : test in vivo avec le baculovirus Bac-CMV-GFP

Cet exemple a pour but de démontrer la capacité du vecteur Bac CMV-GFP à infecter des cellules nerveuses in vivo.

Le vecteur Bac-CMV-GFP à 10^6 pfu a été injecté dans le striatum de rat Sprague Dawley adultes et de souris Nude ou Balb-C adultes. Les coordonnées stéréotaxiques d'injection sont les suivantes :

- 10 - Pour les rats (femelles adultes Sprague Dawley, 200-250g) : injection de 9 μ l à raison de 0,25 μ l par minutes dans le cas d'injection de virus dilué, effectuée selon les mêmes conditions que dans l'exemple 4. Une injection 2 μ l à raison de 0,125 μ l/minute peut également être effectuée.

Coordonnées stéréotaxiques par rapport au Bregma :

A: +1 , V: + 2,3 , L: -5 ,

- 15 - Pour les souris (femelles adultes Nude ou Balb-C, 20-25g) : injection de 2 μ l à raison de 0,1 μ l par minute.

Coordonnées stéréotaxiques par rapport au Lambda :

A: + 4,7 , L: + 1,7 , V: -3,6 ,

- 20 A deux jours et une semaine post-injection, la présence de cellules striatales exprimant la GFP a été détectée dans les deux espèces. Outre le striatum, d'autres cellules exprimant la GFP ont également été détectées dans le corps callum et dans l'épendyme (Figures 6 A, 6 B, 6C et Figure 7).

- 25 Le phénotypage immunohistochimique a permis de mettre en évidence une très grande majorité de cellules GFP/GFAP positive, suggérant un tropisme très préférentiellement glial de ce vecteur dans le cerveau.

Ces résultats démontrent donc de manière évidente la capacité du baculovirus à infecter des cellules neurales in vivo.

REVENDICATIONS

1. Baculovirus recombinant ayant une protéine d'enveloppe baculovirus, comprenant une séquence d'acides nucléiques hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique pour le traitement des maladies du système nerveux.
- 5 2. Baculovirus selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
3. Baculovirus selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique choisi
10 parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.
4. Baculovirus selon la revendication 3, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF,
15 l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et le TGF- β .
5. Baculovirus recombinant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique hétérologue codant pour la β -glucuronidase.
- 20 6. Baculovirus recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un baculovirus exprimant une protéine d'enveloppe autre que celle des baculovirus.
7. Baculovirus selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine d'enveloppe est la glycoprotéine du virus de la rage ou la glycoprotéine de VSV (Vesicular Stomatitis Virus).
8. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il
25 comprend également des séquences promotrices permettant l'expression de la séquence d'acides nucléiques hétérologue.

9. Baculovirus selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séquence promotrice est choisie parmi les promoteurs des gènes NSE (Neuron Specific Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine Hydroxylase), DAT (Dopamine Transporter), ChAT (Choline Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH (Tryptophane Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid Deshydrogenase), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).
10. Baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend également des séquences signal permettant d'induire une sécrétion du produit thérapeutique.
11. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 10 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies du système nerveux.
12. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 11, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène ou une séquence antisens.
13. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques hétérologue est un gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique choisi parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, les facteurs trophiques, les protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides ou des carbohydrates.
14. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que les facteurs trophiques sont choisis parmi les membres de la famille des neurotrophines tels que le NGF, BDNF, NT3, NT4/5 et NT6, les membres de la familles du CNTF tels que le CNTF, l'axokine, le LIF, l'IL6, la cardiotrophine, le GDNF, les membres de la famille des IGF, tels que l'IGF-1, l'IGF-2, les membres de la famille de FGF, tels que le FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, et le TGF- β .
15. Utilisation d'un baculovirus recombinant selon la revendication 13, caractérisé en ce que le gène codant pour un produit d'intérêt thérapeutique est le gène codant pour la β -glucuronidase

16. Population de cellules du système nerveux humain (e.g. cerveau, moelle épinière, cellules neurales, gliales, épendymales), infectée par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10.
17. Implant comprenant des cellules humaines infectées par un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10.
18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs baculovirus recombinants selon l'une des revendications 1 à 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
19. Utilisation de cellules infectées ex vivo par un baculovirus recombinant comprenant un acide nucléique hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique, pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation in vivo.
20. Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que les cellules sont encapsidées dans un système inerte.
21. Utilisation d'un baculovirus recombinant comprenant un acide nucléique hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique, pour la préparation d'une composition destinée au transfert dudit produit dans le système nerveux in vivo par administration intramusculaire et transport rétrograde.
22. Utilisation d'un baculovirus recombinant ayant une protéine d'enveloppe de baculovirus et comprenant un acide nucléique hétérologue codant pour un produit d'intérêt thérapeutique, pour la préparation d'une composition destinée à l'administration in vivo.

BREVET D'INVENTIONNOUVEAUX VECTEURS DERIVES DE BACULOVIRUS ET UTILISATION
POUR LE TRANSFERT D'ACIDES-NUCLEIQUES
DANS LES CELLULES NERVEUSES DES VERTEBRESRHONE-POULENC RORER S.A.ABREGE

L'invention concerne de nouveaux virus recombinants et leur utilisation pour le transfert de gènes dans les cellules du système nerveux des vertébrés. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant lesdits virus recombinants. Plus particulièrement la présente invention concerne de nouveaux vecteurs dérivés des baculovirus et leur utilisation pour le traitement des maladies du système nerveux des vertébrés.

CLAIMS

1. Recombinant baculovirus or derivative
comprising a heterologous nucleic acid sequence
5 encoding a product of therapeutic interest for the
treatment of diseases of the nervous system.
2. Recombinant baculovirus or derivative
comprising a heterologous nucleic acid sequence
----- encoding a product of therapeutic interest and capable -----
10 of infecting and directing the expression of the said
therapeutic product in the cells of the nervous system
of vertebrates, preferably human cells.
3. Baculovirus according to either of
claims 1 and 2, characterized in that the heterologous
15 nucleic acid sequence is an antisense sequence or gene.
4. Baculovirus according to claim 3,
characterized in that the heterologous nucleic acid
sequence is a gene encoding a product of therapeutic
interest chosen from hormones, lymphokines, growth
20 factors, enzymes for synthesizing neurotransmitters,
trophic factors, proteins involved in the metabolism of
amino acids, lipids or carbohydrates.
5. Baculovirus according to claim 4,
characterized in that the trophic factors are chosen
25 from members of the neurotrophin family such as NGF,
BDNF, NT3, NT4/5, NT6, members of the CNTF family such
as CNTF, axokine, LIF, IL6, cardiotrophin, GDNF,

members of the IGF family such as IGF-1 and IGF-2,
members of the FGF family such as FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6,
7, 8, 9, and TGF- β .

6. Baculovirus according to claim 4,
5 characterized in that the gene encoding a product of
therapeutic interest is the gene encoding β -
glucuronidase.

7. Recombinant baculovirus according to one
of claims 1 to 6, characterized in that it is a
10 baculovirus expressing an envelope protein other than
that of baculoviruses.

8. Baculovirus according to claim 7,
characterized in that the envelope protein is the
glycoprotein of the rabies virus or the glycoprotein of
15 VSV (Vesicular Stomatitis Virus).

9. Recombinant baculovirus according to one
of claims 1 to 8, characterized in that it also
comprises promoter sequences allowing the expression of
the heterologous nucleic acid sequence.

20 10. Baculovirus according to claim 9,
characterized in that the promoter sequence is chosen
from the promoters of the NSE (Neuron Specific
Enolase), NF (Neurofilament), TH (Tyrosine
Hydroxylase), DAT (Dopamine Transporter), ChAT (Choline
25 Acetyl Transferase), DBH (Dopamine β -Hydroxylase), TPH
(Tryptophan Hydroxylase), GAD (Glutamic Acid

Dehydrogenase) and GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) genes.

11. Recombinant baculovirus according to one of claims 1 to 10, characterized in that it also
5 comprises signal sequences which make it possible to induce secretion or specific compartmentalization of the therapeutic product.

12. Use of a recombinant baculovirus or derivative comprising in its genome a heterologous
10 nucleic acid sequence encoding a product of therapeutic interest for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment of diseases of the nervous system.

13. Use of a recombinant baculovirus
15 according to claim 12, characterized in that the heterologous nucleic acid sequence is an antisense sequence or gene.

14. Use of a recombinant baculovirus according to claim 13, characterized in that the
20 heterologous nucleic acid sequence is a gene encoding a product of therapeutic interest chosen from hormones, lymphokines, growth factors, enzymes for synthesizing neurotransmitters, trophic factors, proteins involved in the metabolism of amino acids, lipids or
25 carbohydrates.

15. Use of a recombinant baculovirus according to claim 14, characterized in that the

trophic factors are chosen from members of the neurotrophin family such as NGF, BDNF, NT3, NT4/5 and NT6, members of the CNTF family such as CNTF, axokine, LIF, IL6, cardiotrophin, GDNF, members of the IGF family such as IGF-1 and IGF-2, members of the FGF family such as FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and TGF- β .

16. Use of a recombinant baculovirus according to claim 14, characterized in that the gene encoding a product of therapeutic interest is involved in lysosomal diseases and in particular the gene encoding β -glucuronidase.

17. Population of cells of the nervous system (e.g. brain, spinal cord, neural, glial or ependymal cells [lacuna], which is infected with one or more recombinant baculoviruses according to one of claims 1 to 11.

18. Implant comprising human cells infected with one or more recombinant baculoviruses according to one of claims 1 to 11.

19. Pharmaceutical composition comprising one or more recombinant baculoviruses according to one of claims 1 to 11, in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle.